

研 究 報 告 書

「生体丸ごとの全時間スケールに起こる反応を評価する技術の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 山本 正道

1. 研究のねらい

これまで疾患は臓器毎の異常として個々に解析され、ネットワークで繋がった生体内臓器全体として一次的に解析する方法が欠如していた。そのため、臨床で遭遇する多くの合併症を正確に説明するメカニズムや情報が十分得られてきていなかった。

生体内臓器全体で共通するアデノシン三リン酸(以下 ATP)は細胞内の主要なエネルギー通貨であり、筋肉の収縮や細胞運動、膜輸送、代謝反応、タンパク質分解だけでなく、生命の恒常性を維持する事に必須なシグナル伝達のリン酸化因子や遺伝子発現ネットワークを制御するクロマチン構造といった様々な生体内の反応を量依存的に制御している。

そこで、生体丸ごと(全臓器・全細胞)の全時間スケール(ミリ秒から月単位)に起こる反応を一次的に評価する技術として、マウス生体内にて全臓器・細胞で共通の生体エネルギー通貨である ATP の量と動態を細胞レベルで定量的かつ非侵襲的に計測する技術を確立する事とその応用性を提示する事を目指した。

2. 研究成果

(1)概要

マウス生体内で ATP 量を非侵襲的に計測できる様に、マウス ROSA26 領域に FRET 型蛍光タンパク質である ATP センサー(GO-ATeam)をノックインする構築で作出した(ATP 可視化マウス)。このマウスは蛍光顕微鏡下で観察した所、十分な蛍光輝度値を示した。Metamorph を用いて FRET ratio 画像を作成した所、各臓器の ATP 量に差異が存在する事が示された。また、この差異は過去の生化学的な ATP 量計測の研究で報告されている差異に類似していた。蛍光の FRET ratio 値から ATP 量を定量的に計測できる可能性を検証するため、異なる材料と方法を用いて実験を行った。具体的には、材料は ATP 可視化マウスから受精卵と樹立した胚性繊維芽細胞を用いて、方法は ATP 濃度を人為的に変化させた時の蛍光 FRET ratio 値の変化とルシフェラーゼ法を用いた生化学的方法を用いて行った。その結果、ATP 可視化マウスを用いれば蛍光 FRET ratio 値から ATP 量を定量的に計測する事が可能である事が示された。この結果を用いてマウス生体内の各臓器・各細胞の蛍光 FRET ratio 値を調べると細胞毎に ATP 量が異なる事を世界で初めて見出す事に成功した。また、骨格筋が収縮運動する際の ATP 動態を観察すると、運動量に相関して ATP 量が低下する事が示された。更に、既存のトルク計測法よりも高感度に運動量を区別できる事も明らかとなった。この様な性能を有した ATP 可視化マウスを用いて疾患時における臓器間ネットワークを可視化できるかを検討した。特に心筋梗塞時における臓器間ネットワークを臓器・細胞レベルで検討した。その結果、臓器レベルでは心筋梗塞発症 12 分や 13 分後に小腸や大腸で ATP 量が有意に低下し、31 分や 32 分後に肝臓や腎臓で ATP 量が有意に低下して

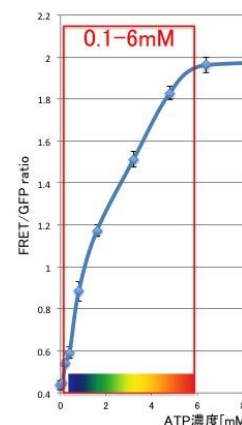
いく事を見出した。細胞レベルで詳細に調べた結果、肝臓では心筋梗塞発症 10 分後から中心静脈近傍のみで ATP 量が低下しはじめ、この低下の分布は 60 分後でも同様であった。一方、大腸では心筋梗塞発症 5 分後から ATP 量の低下が始まったが、腸陰窩と粘膜固有層では ATP 量低下率に差があった。この結果から、疾患時における臓器間ネットワークを細胞レベルで解析する事ができるシステムが構築できたと考えられる。次に、このシステムを用いて新たな疾患関連因子のスクリーニングが可能かを検討した。質量分析イメージング法を用いて心筋梗塞発症 20 分後に肝臓の中心静脈近傍のみで変化してくる因子探索を行った結果、トリプトファン代謝産物であるキヌレン酸が上昇してくる事を見出した。キヌレン酸は心筋梗塞時に肝臓から血中に放出されて心保護的に働くという報告がされている。このことから、臓器間ネットワーク情報を用いれば新たな因子スクリーニングに利用できる可能性が示された。

(2) 詳細

2-1 マウス生体内で ATP 量を定量的に計測

ATP 可視化マウス生体内で、GO-ATeam の蛍光 FRET ratio 値から非侵襲的に ATP 量を計測できる可能性を検証するため、ATP 可視化マウスから胚性繊維芽細胞を樹立した。胚性繊維芽細胞の細胞膜に alpha-toxin を用いて ATP が通過できるだけの穴を開けた後に、培養液に様々な ATP 量を添加して、ATP 量と蛍光 FRET ratio 値を計測した。その結果、ATP 量が 0.1 から 6.0mM の間に蛍光 FRET Ratio 値が 0.4 から 2.0 ヘシグモイドカーブを描いて変化し、誤差値も 1%以下で非常に小さいものであった(図 1)。この検量線の結果から蛍光 FRET ratio 値から ATP 量を計算する事が可能であると示唆された。

しかし、この検量線は胚性繊維芽細胞特異的である可能性が考えられたため、異なる材料・異なる方法でも蛍光 FRET ratio 値から ATP 量を計算できるかを検討した。材料は ATP 可視化マウスの受精卵を用いて、方法は生化学的なルシフェラーゼ法を用いて、受精卵に ATP 合成阻害剤である 2deoxy-glucose と Antimycin を添加した時に起こる ATP 量の低下過程を利用した。その結果、胚性繊維芽細胞で得られた検量線を用いた結果と同じ ATP 量および経時過程を得る事ができた。この結果から本 ATP 可視化マウスは蛍光 FRET Ratio 値から ATP 量を定量的に計測する事が可能であると示された。



2-2 マウス生体内における細胞レベルでの ATP 分布

これまで、マウス生体内の各臓器間で ATP 量が異なるという報告はなされていたが、

細胞毎にどの程度異なっているのかは不明であった。そこで、2 光子顕微鏡を用いて各臓器の ATP 量を細胞レベルで調べる事にした。ATP 可視化マウスを麻酔下で気管挿管を行い、intravital で観察を行った。その結果、例



例えば小腸ではパネート細胞で ATP が約 2.2mM に対して、腸幹細胞では約 1.6mM、間質細胞では約 0.6mM と全く異なる事が明らかとなった(図 2)。

2-3 マウス生体内で生理的な ATP 動態を計測

これまで同じサンプル内の ATP 量の動態は MRS(核磁気共鳴スペクトロスコピー)などで調べられてきたが、分オーダーの変化を捉えられるに留まっていた。そこで、骨格筋が収縮する時に変化する ATP 動態を高時間分解で検討

した。方法としては坐骨神経を電気刺激する事により起こる前頸骨筋の収縮運動を計測する事にした。その結果、骨格筋収縮と共に 0.1 秒の時間分解で ATP 量が低下する事を捉える事に成功した(図 3)。更に、これまでに坐骨神経を電気刺激する頻度(ヘルツ)を増加させる事で運動量(トルク)が増加する事が報告されているが、その時の ATP 動態を計測すると運動量に相関して低下する事を見出した。更に、10Hz と 20Hz は運動量で差異を測定できなかったが、ATP 動態では 1Hz と 2Hz の違いも差異を見出す事ができる定量性と誤差値の小さい事も明らかとなった(図 3)。

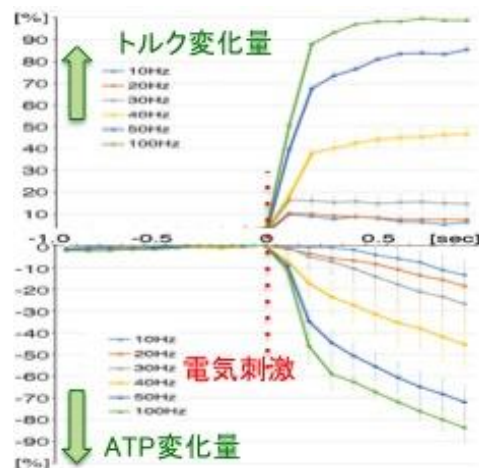


図 3:骨格筋運動時の ATP 量変化

2-4 疾患時における臓器間ネットワークの可視化

これまで疾患は臓器毎の異常として個々に解析され、ネットワークで繋がった生体内臓器全体として一次元的に解析する方法が欠如していた。最近になり、数個の臓器間・細胞間ネットワークが解析されているに過ぎない。そこで、今回作出した ATP 可視化マウスを用いて ATP 量の側面から疾患時における臓器間ネットワークの解析を検討した。疾患は発症時期を制御できて全身への影響が早くから引き起こされると考えられた心筋梗塞を選択した。ATP 可視化マウスの心臓冠動脈の一つである左前下行枝を糸で結紮した心筋梗塞モデルマウスを作出し、5 日後に全臓器の ATP 量を観察した。その結果、心臓では梗塞領域の左心室で ATP 量の大幅な低下が観察された。同様に、肝臓・腎臓・小腸・大腸でも ATP 量の低下が観察された。そこで、より早い時期の ATP 量変化を調べるため、ATP 可視化マウスを麻酔下で気管挿管を行い、開腹・開胸した状態を蛍光顕微鏡で観察しながら、左前下行枝を結紮する事で心筋梗塞モデルを作製した。臓器レベルで ATP 動態を観察する事で臓器間ネットワークを検討した所、コントロールマウスと比較して小腸や大腸では 12 分後、13 分後に ATP 量が有意に低下し、肝臓や腎臓では 31 分後、32 分後に低下してくるという心筋梗塞時に連関する臓器とタイミングが異なっている事が示された。更に詳細に調べるため、同様の実験を細胞レベルで検討する事にした。大腸では心筋梗塞発症 5 分後位から腸陰窩と粘膜固有層で ATP 量の低下が観察されたが、60 分後まで観察すると腸陰窩と比較して、粘膜固有層では低下が顕著であった。一方、肝臓では心筋梗塞発症 10 分後から中心静脈近傍のみで ATP 量の低下が始まり、60 分後でも中心静脈近傍のみで ATP 量が低下し、門脈近傍領域では ATP 量が低下せず維持され続けていた。この心筋梗塞時の肝臓全体をメ

タボローム解析で調べると、心筋梗塞 20 分後では酪酸が僅かに低下する以外は NADH やコハク酸が有意差を持って変化しない事から虚血に陥っていない事が裏付けられた。同時に ATP、ADP や AMP 値に変化を見出す事ができなかった。そこで、中心静脈近傍のみで ATP 量の低下が検出できるかを質量分析イメージング法を用いて行った。その結果、ATP 可視化マウスで得られた結果と同様に中心静脈近傍のみで ATP 量が低下している結果が得られた。この結果から疾患時における臓器間ネットワークを細胞レベルかつミリ秒単位で詳細に解析できる新しい方法が開発できた。

2-5 臓器間ネットワーク情報を用いた新たな疾患関連因子のスクリーニング

心筋梗塞発症 10 分後から肝臓では中心静脈近傍のみで ATP 量が低下するという臓器間ネットワーク情報を利用して、心筋梗塞関連因子のスクリーニングを行った。具体的には心筋梗塞発症 20 分後の肝臓の中心静脈近傍のみで変化する因子の探索を行った。疾患発症 20 分後、ATP 量低下 10 分後という非常に短い時間帯での因子探索のため、代謝産物に絞って質量分析イメージング法を用いた解析を行った。その結果、トリプトファン代謝産物の一つであるキヌレン酸が心筋梗塞発症 20 分後に中心静脈近傍のみで有意に上昇してくる事を見出した。この上昇は肝臓全体を用いた解析では得る事ができなかった。これまでキヌレン酸は心筋や骨格筋などで虚血が生じた時に血中に現れて、心筋梗塞巣の縮小に機能しているという心保護機能が報告されている。更に、肝臓由来の培養細胞株に低酸素処理を行うとキヌレン酸合成が亢進する事も報告されている。この事から、臓器間ネットワーク情報を用いれば新たな疾患関連因子スクリーニングに利用できる可能性が示された。

3. 今後の展開

マウス生体内で臓器レベルから細胞レベルまで細胞質内の ATP 量を定量的かつ非侵襲的に計測できるシステムが構築され、疾患時の臓器間ネットワークの可視化やこの情報を利用した疾患関連因子スクリーニングへの応用性が示された。これを利用して、細胞内や核内の ATP 分布と動態を高解像に可視化する事で細胞骨格動態、シグナル伝達、転写の活性などが推測できる可能性が期待される。また、各臓器・細胞内の ATP 量が表す生命機能を解明する事で ATP 量の計測により間接的に生命現象を明らかにできるようになると期待される。更に、臓器間ネットワークの可視化と疾患関連因子スクリーニングの応用性を利用して、アルツハイマー病などの難治性疾患の解明と疾患原因臓器以外の他臓器の機能など全身・全臓器を対象とした病態解明や治療法開発への応用が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的である生体丸ごと(全臓器・全細胞)の全時間スケール(ミリ秒から月単位)に起こる反応を一次元的に評価する技術として、マウス生体内にて全臓器・細胞で ATP の量と動態を細胞レベルで定量的かつ非侵襲的に計測する技術を確立する事とその応用性を提示する事を目指した。結果、ATP 可視化マウスの性能として全臓器・細胞で ATP 量と動態を計測できる事を 2 光子顕微鏡を用いて明らかにした。また、蛍光 FRET ratio 値から ATP 量を定

量的かつ非侵襲的に計測できる事を明らかにした。更に、ミリ秒単位での ATP 動態を計測できる事も明らかにした。応用性としては、臓器ネットワークを可視化できるか検討した。心筋梗塞発症後に腹腔内臓器での ATP 動態を計測する事により、複数の臓器で異なるタイミングに臓器間ネットワークを介した ATP 量への影響があらわれることを明らかにした。更に、各臓器を細胞レベルで解析する事により、臨床的に心筋梗塞発症患者で傷害が大きな臓器・細胞で急速に ATP 量が低下していく事も見出した。更に、心筋梗塞後の肝臓では ATP 量が中心静脈近傍のみで低下する特徴的な結果が得られたため、これを利用して疾患関連因子スクリーニングを行った。これにより、心筋梗塞時の肝臓で産生されて心保護的に働くと言う報告があるキヌレン酸が中心静脈近傍のみで産生上昇していること、この上昇は肝臓全体を用いてスクリーニングしても見出せない事を示してきた。キヌレン酸以外の新規疾患関連因子の抽出と機能解析まで到達する事はできなかったが、マウス生体内全身で ATP 量を定量的かつ非侵襲的に計測できるシステムを確立し、疾患後の臓器間ネットワークの可視化から疾患関連因子スクリーニングへの応用性を示す事ができた事は研究目的を最低限達成できたと思う。この論文を期間内に受理される所までできればより良かったと思う。

研究の進め方としては、実施体制として十分なチームを形成できなかった事が進展を遅らせた原因でした。研究費執行状況としては、初年度にほとんどの研究費を使用してイメージングシステムを導入した事が成功だった。カスタマイズできない共通機器では得ることのできない重要な情報を得る事ができた。

研究成果の科学技術への波及効果としては、これまでは生体内の ATP 量は過剰量存在し、疾患や老化などで変化していくと漠然と考えられていた。この概念を今回開発したシステムを用いる事により科学的な検証ができるようにしたため、このシステムを利用した循環器・脳神経・消化器・運動・老化など生命現象のあらゆる分野で利用が始まっている。現在は国内に限って共同研究を進めているが、論文発表後は海外との共同研究が飛躍的に増えると考えられる。また、最近では経済界(特に製薬業界と食品業界)での本システムの使用計画が進んでいる。現段階では組織・細胞の生存能という側面がほとんどであるが、脳神経解析から得られたような ATP 量が制御する高次機能や骨格筋運動から得られた ATP 動態(変化量)の表す意義を明らかにする事で、更なる応用が期待される。また、細胞外フラックスアナライザーの生体内版として利用できるようになれば、応用範囲の拡大と信頼性が増すと期待される。更に、細胞の各コンパートメントにおける ATP の役割は異なるため、本マウス構築と性能評価の戦略を応用してシステムを構築すれば、各コンパートメントの ATP 量測定による生命機能とその変化を非侵襲的かつ詳細に解析できるようになると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では生体丸ごと(全臓器・全細胞)の全時間スケール(ミリ秒から月単位)に起こる反応を一次元的に評価する技術として、マウス生体内にて全臓器・細胞で共通の生体エネルギー物質であるアデノシン三リン酸(以下 ATP)の量と動態を細胞レベルで定量的かつ非侵襲的に計測する技術を確立する事とその応用性を提示する事を目指した。生体内臓器全体で共通する ATP は細胞内の主要なエネルギー物質であり、筋肉の収縮や細胞運動、膜輸

送、代謝反応、タンパク質分解だけでなく、生命の恒常性を維持する事に必須なシグナル伝達のリン酸化因子や遺伝子発現ネットワークを制御するクロマチン構造といった様々な生体内の反応を量依存的に制御している。従って、この技術の確立は臓器間ネットワークの理解のみならず、生命活動の理解に必須のものである。

実際、山本正道研究者はこの技術を確認し心筋梗塞時の各臓器における ATP 量の変化を経時点に成功している。今後、この技術を各種病態に応用することにより、生体の平衡維持機構について新知見が得られることが多いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nimura, K., Yamamoto, M., Takeichi, M., Saga, K., Takaoka, K., Kawamura, N., Nitta, H., Nagano, H., Ishino, S., Tanaka, T., Shwartz, R.J., Aburatani, H., Kaneda, Y. Regulation of alternative polyadenylation by Nkx2-5 and Xrn2 during mouse heart development. *ELife*, 2016, 5: e16030
2. Nakano, M., Imamura, H., Sasaoka, N., Yamamoto, M., Uemura, N., Shudo, T., Fuchigami, T., Takahashi, R. and Kakizuka, A. ATP Maintenance via Two Types of ATP Regulators Mitigates Pathological Phenotypes in Mouse Models of Parkinson's Disease. *EBioMedicine*, 2017, 22: 225-241

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 山本 正道

発明の名称: ATP 可視化動物およびその用途

出 願 人: 群馬大学/京都大学

出 願 日: 2014/1/15

出 願 番 号: 特願 2014-005429 / PCT/JP2015/050932

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Yamamoto, M., Visualization of ATP level in vivo, International Symposium by ASRLD-Unit , 2014 年 11 月 14 日, Maebashi, Japan
2. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態, 第 9 回 NIBB バイオイメージングフォーラム, 2015 年 1 月 27 日, 岡崎
3. 山本正道, 生体内におけるエネルギー動態, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸
4. Yamamoto, M., Visualization of ATP level in vivo, CREST International Symposium 2015 , 2015 年 12 月 26 日, Okazaki, Japan

5. 山本正道, マウス全身における ATP 代謝動態の可視化, 第 11 回生体イメージング研究会、2016 年 2 月 12 日、兵庫
6. 山本正道, Visualization of ATP level in vivo, 第 93 回 日本生理学会大会, 2016 年 3 月 22 日、札幌
7. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態の可視化, 第 88 回 日本遺伝学会, 2016 年 9 月 9 日、三島
8. Ohtsuki, G., Ishihara, Y., Miwa, H., Aoki, H, Tsuchita, H., Ogasawara, R., Sakamoto, K., Yanagita, M., Imamura, H. and Yamamoto, M., Visualizing Spaciotemporal and Quantitative Dynamics of ATP Levels in Mouse , Cell Excise Symposium, 2017 年 5 月, Gothenburg, Sweden
9. 山本正道, Visualizing ATP dynamics in live mice, 第4回六甲医学研究会, 2017 年 11 月 11 日、兵庫
10. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態-アルツハイマー病モデル及び統合失調症モデルについて, ConBio2017, 2017 年 12 月 15 日, 神戸
11. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態解析, 第 15 回生体イメージング研究会, 2018 年 1 月 12 日、兵庫
12. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態の可視化、第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年会, 2018 年 2 月 23 日、名古屋
13. 山本正道, マウス生体内における ATP 動態の可視化、第 6 回骨格筋生物学会、2018 年 3 月 10 日、札幌